

## Ege Üniversitesi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültelerinin kan merkezlerine başvuran HBsAg negatif kan vericilerinde HBV-DNA varlığının araştırılması

Investigation of the presence of HBV-DNA in HBsAg negative blood donors admitted to the blood transfusion centers of the Faculty of Medicine of Ege University and Mersin University

Arzu Bayram<sup>1</sup> Seda Tezcan<sup>2</sup> Aysu Değirmenci<sup>3</sup> Gürol Emekdaş<sup>2</sup> Ajda Turhan<sup>3</sup>  
Selda Erensoy<sup>4</sup> Yeşim Aydınok<sup>3</sup> Naci Tiftik<sup>2</sup> Rüçhan Yazan Sertöz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi, Kan Merkezi, Mersin, Türkiye

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kan Merkezi, İzmir, Türkiye

<sup>4</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### Öz

**Amaç:** Kan yoluyla bulaşan enfeksiyon etkenleri arasında hepatit B virüsü (HBV) önemini korumaktadır. Serolojik testlerin duyarlılığının artırılmasına rağmen güvenli kan transfüzyonu için kanda HBV-DNA varlığını saptayan nükleik asit testi (NAT) uygulamaları, özellikle de tek tek örneklere uygulanan NAT (ID-NAT) uygulamaları gündeme gelmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'ne Nisan 2010 ile Ocak 2011 tarihleri arasında başvuran 18–65 yaşları arasındaki 4352 HBsAg negatif kan vericisinin serum örnekleri incelenmek üzere çalışmaya alındı. Kan vericilerinin örneklerinde HBV-DNA'yı saptamak amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi uygulandı.

**Bulgular:** Çalışılan örneklerden sadece 2 serumda HBV-DNA şüpheli pozitif olarak saptandı. İki pozitif sonuç aynı yöntemle iki kez ve farklı alternatif yöntemlerle doğrulamak amacıyla tekrarlandı. Tekrarlanan örneklerin negatif bulunması sonucunda örneklerin tümünde HBV-DNA negatif olarak değerlendirildi. İki ayrı merkezden alınan HBsAg negatif kan vericilerinin tüm örneklerinde HBV-DNA negatif bulundu.

**Sonuç:** Çalışmaya alınan kan vericilerin sayısı ve merkezlerdeki düşük seroprevalans gizli HBV görülmemesinin nedeni olabilir. Türk Kızılayı'nın 2014'de başlayan rutin NAT çalışmaları bölgemizdeki gizli HBV verilerini daha net ortaya çıkaracaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Kan vericisi, Hepatit B virüsü, HBV-DNA, nükleik asit testleri

### Abstract

**Aim:** Hepatitis B virus (HBV) remains important among the agents of blood transmitted infections. Although increased sensitivity of serological tests, detection of HBV-DNA by nucleic acid tests (NAT) techniques, especially by the individual NAT (ID-NAT) techniques for safe blood transfusion came into question.

**Materials and Methods:** A total of 4352 HBsAg negative volunteer-donors in ages of 18-65 years admitted to the Blood Transfusion Centers of Ege University Faculty of Medicine and Mersin University Faculty of Medicine Hospital were included in the study between April 2010 and January 2011. The samples of the donors were tested with real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in order to detect HBV-DNA.

**Results:** Following HBV-DNA screening, only two positive serum results were found. Test was repeated on two positive samples with both the same and an alternative method. Repeated tests resulted negative; therefore all samples were assessed as HBV-DNA negative. In all samples of HBsAg negative donors from two different centers, HBV-DNA was found to be negative.

**Conclusion:** The number of blood donors included in the study and low seroprevalence of the centers could be the reason for no detection of occult HBV. Turkish Red Crescent routine NAT studies that began in 2014 will give appropriate data for occult HBV in our region.

**Keywords:** Blood donor, Hepatitis B virus, HBV-DNA, nucleic acid tests.

Yazışma Adresi: Arzu Bayram

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 06.05.2015 Kabul Tarihi: 30.06.2015

## Giriş

Kan yoluyla bulaşan enfeksiyon etkenlerinin geçişi sağlıklı görünen kan vericilerinden yapılan enfekte transfüzyonlar sonucunda olmaktadır. Bu nedenle uygulanan tarama testlerine rağmen kan güvenliğinin geliştirilmesi önemli bir tartışma konusudur (1). Güvenilir kana ulaşmada en önemli ve temel nokta, kan vericilerin dikkatli seçimidir (2).

Kan yoluyla bulaşan enfeksiyon etkenleri arasında görülme sıklığı ve neden olduğu hastalıklar Hepatitis B virüsü (HBV) halen önemini korumaktadır (3). Ülkelerin sağlık politikası, alınan önlemler, eğitim, ekonomik koşullar gibi pek çok faktör HBV enfeksiyonunun görülme sıklığında farklılıklara neden olur. HBV ile karşılaşma oranı Batı Afrika'da en yüksek, Batı Avrupa ve Kuzey Amerika'da en düşük düzeydedir (1). Ülkemizde yapılan çalışmalarda HBV yüzey antijeni (HBsAg) pozitifliği bölgeden bölgeye değişmekle birlikte %1.7-21 olarak saptanmıştır (4). Ancak, HBsAg tarama testleri duyarlılıkları yıllar içinde geliştirilmiş olmakla birlikte HBV enfeksiyonunu saptamakta her zaman yeterli olamamaktadırlar (5). Bu nedenle dünyada ve ülkemizde "güvenli kan" için 2006 yılından sonra transfüze edilen kan örneğinde HBV nükleik asit testi (NAT) uygulamaları gündeme gelmiştir (1,6,7). Bu teknik ile pencere dönemi dışında HBsAg negatif gizli HBV enfeksiyonunun tanısı sağlanmaktadır (5).

Bu çalışmada, tek tek NAT (ID-NAT) ile HBsAg negatif kan vericilerinde olası gizli HBV enfeksiyonunun araştırılması ve ülkemizde uygulanmakta olan kan vericisi tarama testlerine yeni bir düzenleme getirilip getirilemeyeceği konusunun belirlenmesi ve olası yeni bir algoritma oluşturulmasına katkıda bulunabilmek amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Kan Merkezi ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi (MÜTF) Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'ne Nisan 2010 ile Ocak 2011 tarihleri arasında başvuran 18-65 yaşları arasındaki HBsAg negatif 4352 kan vericisinin serum örnekleri incelenmek üzere çalışmaya alındı. Kan vericilerinin HBsAg taraması kemilüminesan mikropartikül immünassay (CMIA, Architect i2000SR, Abbott Laboratories, USA) yöntemi ile çalışıldı.

### Plazma örneklerinin saklanması

Çalışma için kan vericilerinden ek bir kan örneği EDTA'lı (Becton Dickinson, Fransa) tüpe alındı. Tarama test sonuçları negatif bulunan verici örnekleri 14000 rpm'de 30 dakika santrifüjledikten sonra plazma örnekleri filtrelili pipet uçları kullanılarak "DNAz" ve "RNAz" içermeyen steril tüplerde -80°C'de saklandı.

### Plazma örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Plazma örnekleri -80°C'den çıkartılıp numara sıralarına göre sıralandıktan sonra oda ısısında erimlerinin

ardından kısaca vortekslenip 14000 rpm'de hızlı bir şekilde santrifüjlendi. Ekstraksiyon, "QIASymphony Virus/Bacteria Mini Kit" (QIAGEN, Almanya) otomatik ekstraksiyon kiti kullanılarak QIASymphony (QIAGEN, Almanya) cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

### HBV-DNA'nın çoğaltılması

HBV-DNA'nın 134 bp'lik kor bölgesini hedef alan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kiti (artus HBV QS-RGQ Kit, QIAGEN, Almanya) ile gerçek zamanlı PCR cihazında (ROTOR GENE Q, CORBETT Research Pty Ltd., Avusturya) üretici firma önerilerine uygun olarak HBV-DNA amplifiye edilmiştir.

Her bir çalışmada plaklarda elde edilen 63 hasta örneği ile birlikte beş standart, bir negatif kontrol, bir adet E2 düzeyinde QCMD örneği miks karışımları ile otomatik olarak PCR tüplerine pipetlendi (QIAGility, QIAGEN, Almanya). PCR tüpleri, ROTOR GENE Q gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirilerek aşağıdaki ısı döngü programı uygulandı.

Internal kontrol (IC) pozitif bulunan örneklerin HBV-DNA sonuçları değerlendirilmeye alındı. Kantitasyon, üretici firmanın önerilerine uygun olarak kite ait beş adet standart yardımıyla çizilen eksternal kantitasyon eğrisi ile yapılmaktadır. Yöntemin kantitasyon aralığı 31.6 IU/mL ile  $2 \times 10^7$  IU/mL arasında ve testin analitik duyarlılığı 10.22 IU/mL'dir.

Çalışmamız için EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır.

## Bulgular

Çalışılan 4352 örneğin 1971'i EÜTF Kan Merkezi'ne, 2381 MÜTF Kan Merkezi'ne aitti. Çalışmaya dahil edilen örneklerin 4181'i erkek (%96.1) ve yaş ortalaması 35.6 yıl (yaş aralığı 18-64 yıl) idi.

Çalışılan örneklerden sadece 2 serumda HBV-DNA pozitif olarak saptandı. Örneklerden, HBV-DNA süpheli pozitif saptanan birinci örneğin eğrilerinin eşik değeri kestiği siklus (ct) 41.6 ve viral yük (IU/mL)  $2.08E+00$ , ikinci örneğin ct değeri 43.86 viral yük (IU/mL)  $2.49E+00$  bulundu. Şüpheli pozitif olan birinci ve ikinci örneklere aynı yöntemle iki kez ve diğer alternatif yöntemler uygulanarak sağlamaları yapıldı.

Bu örneklerle, İlk PCR ürünlerinin pozitif kontrol örnekleri ile jelde görüntülenmesi negatif olarak değerlendirildi. Aynı ekstraksiyondan tekrar gerçek zamanlı PCR (artus HBV QS-RGQ Kit, QIAGEN, Almanya) uygulandı. Sonuç negatif olarak bulundu. Inno-LiPA HBV DR Line Probe assay (Innogenetics N.V. Ghent, Belçika) PCR'ı ile de jel negatif bulundu.

## Tartışma

HBV enfeksiyonunun tanısında serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda geliştirilen

moleküler yöntemler ile HBV-DNA düzeylerinin belirlenmesi ile HBsAg düzeyi negatif olan kişilerde HBV enfeksiyonu tanısına olanak sağlanmıştır (8).

Ülkemizde 1972 yılından itibaren çeşitli gruplarda HBsAg taranmaktadır (9). Türkiye'deki HBsAg seroprevalansı değerlendirildiğinde ülkemiz HBV taşıyıcılığı açısından orta derecede endemik bir bölgedir (4). Bu çalışmadaki merkezlere, Nisan 2010 ile Ocak 2011 arası EÜTF Kan Merkezi'ne 16.968, MÜTF Kan Merkezi'ne 10.298 kan vericisi başvurmuştur. Başvuranların EÜTF'de 98'i (%0.5), MÜTF'de 200'ünde (%1.94) HBsAg pozitifliği saptandı. Bu oran ülkemizdeki diğer çalışma verilerinden düşük bulunmuştur. Bu düşük oran beklenen gizli HBV enfeksiyon oranlarına da yansımaktadır.

Ülkemizde moleküler yöntemler ile kan vericilerinde HBV-DNA düzeylerinin tarandığı çalışmalar bulunmaktadır. Türk Kızılay Kan Merkezi Haziran 2007-Eylül 2008 yılları arasında 12.852 HBsAg negatif kan vericisinde ID-NAT (Tigris-Chiron, USA) yöntemi ile örneklerin %0.047'inde HBV-DNA düzeyi pozitif olarak saptanmıştır (10). Kemahlı ve arkadaşlarının 7372 kan vericisinde yaptığı çalışmada ise HBsAg negatif örneklerin ikisinde HBV-DNA pozitif (%0.03) tespit etmiştir (11). Bal ve ark. (12), çalışmasında ise 8333 transfüzyonda bir HBV-DNA pozitifliği (% 0.012) bulunmuştur.

Bu çalışmada da HBsAg negatif bulunan 4352 kan vericisinde başlangıçta iki adet pozitiflik saptanmış ancak aynı yöntemle ve alternatif diğer yöntemlerle pozitiflikleri doğrulanamamıştır. Sonuç olarak örneklerde pozitifliğe rastlanmamıştır. Ancak gizli HBV enfeksiyonunda örneklerde düşük DNA pozitiflikleri bulunmaktadır. 4352 örneğin ikisinde de HBV-DNA düzeyleri düşüktür. Bu durum örneklerin yinelenen testlerde pozitif bulunma olasılığını da düşürmektedir.

Yang ve ark. (13) çalışmasında da aynı kan verici popülasyonunda tek tek NAT ve havuz NAT ile DNA pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Bu nedenle, gizli HBV'de HBV-DNA düzeyi düşük olduğu için duyarlı testler kullanılması gerekmektedir. Gizli HBV enfeksiyonunda HBV-DNA miktarı düşüklüğünden dolayı tekrarlayan PCR pozitifliklerine her zaman rastlanmayabilir. Bu yüzden özellikle kan merkezlerinde gizli HBV saptanmasında NAT uygulanacaksa havuzlama yöntemi yerine duyarlılığı yüksek tek tek uygulanan moleküler testler tercih edilmelidir. Ayrıca test sonuçlarının doğruluğunu göstermek için aynı ve farklı yöntemler uygulanarak doğrulanması yapılmalıdır.

#### Sonuç

Sonuç olarak, İki ayrı merkezden alınan HBsAg negatif kan vericisinin tüm örnekleri negatif bulunmuştur.

#### Kaynaklar

1. Allain JP, Stramer SL, Carneiro-Proietti ABF, et al. Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biologicals* 2009;37(2):71-7.
2. Uluhan R. Güvenli kan. *Ankem Derg* 2007;21(Ek2):142-5.
3. Ustaçelebi Ş, Ergünay K. Hepatit B virüsün (HBV) moleküler virolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed). *Viral Hepatit 2007*. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği; 2005:96-107.
4. Özdemir D, Kurt H. Hepatit B virüsü enfeksiyonlarının epidemiyolojisi. Tabak F, Balık İ, Tekeli E (ed). *Viral Hepatit 2007*.1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği; 2007:108-17.
5. Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: Implications. *Vox Sang* 2004;86(2):83-91.
6. Roth WK. Hepatitis B and blood transfusion. *ISBT Science Series* 2007;2(2):178-83.
7. Avcı İY, Turhan V, Çınar E. Kan nakli ile bulaşan enfeksiyon hastalıkları. *T Klin J Med Sci* 2000;20(5):317-24.
8. Özsan M. HBV enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanı. Tabak F, Balık İ, Tekeli E. (eds) *Viral Hepatit 2007*. 1. Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2005;124-33.
9. Taşyaran MA. HBV enfeksiyonu epidemiyolojisi. Kılıçtırgay K, Badur S. (eds) *Viral Hepatit 2001*. 1.Baskı. İstanbul: Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001;121-8.
10. Altunay H, Koşan E, Birinci I, et al. Are isolated anti-HBc blood donors in high risk group? The detection of HBV DNA in isolated anti-HBc cases with nucleic acid amplification test (NAT) based on transcription-mediated amplification (TMA) and HBV discrimination. *Transfus Apher Sci* 2010;43(3):265-8.
11. Kemahlı S, Solaz NN, Bozdayı M, Cin. NAT screening of HBV in blood donors. *Transfus Clin Biol* 2001;8(1):18.
12. Bal SH, Heper Y, Kumaş LT, Mistık R, Töre O. İzole anti-HBc olgularda HBV-DNA varlığının araştırılması ve bu olguların kan bankacılığı açısından önemi. *Mikrobiyol Bul* 2009;43(3):243-50.
13. Yang MH, Li L, Hung YS, et al. The efficacy of individual-donation and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in Taiwan. *Transfusion* 2010;50(1):65-74.